

New G protein conjugate receptor protein and related DNA - useful for screening for drugs to inhibit G protein-ligand binding**Patent Assignee: TAKEDA CHEM IND LTD****Patent Family**

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
JP 8245697	A	19960924	JP 9557187	A	19950316	199648	B

Priority Applications (Number Kind Date): JP 9557187 A (19950316)**Patent Details**

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
JP 8245697	A		25	C07K-014/705	

Abstract:

JP 8245697 A

A G protein conjugate receptor protein (I) having the 252 amino acid sequence given in the specification, or its salt, is new.

USE - The protein can be used for the development of new drugs.

Dwg.0/3

Derwent World Patents Index

© 2002 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 10985308

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-245697

(43)公開日 平成8年(1996)9月24日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 14/705		8517-4H	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 14/725		8517-4H	C 0 7 K 14/725	
C 1 2 N 15/09	Z N A		C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02			G 0 1 N 33/566	

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 25 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-57187

(22)出願日 平成7年(1995)3月16日

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 日沼 州司

茨城県つくば市春日1丁目7番地の9 武
田春日ハイツ1402号

(72)発明者 藤井 亮

茨城県つくば市春日1丁目7番地の9 武
田春日ハイツ303号

(72)発明者 伊藤 康明

茨城県土浦市桜ヶ丘町36番地の16

(74)代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外2名)

(54)【発明の名称】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、その製造法および用途

(57)【要約】 (修正有)

【構成】ウサギ胃幽門部平滑筋由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチド、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造法、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニング方法またはスクリーニング用キット、スクリーニング方法またはスクリーニング用キットで得られる化合物またはその塩、化合物またはその塩を含有する医薬組成物、該蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体。

【効果】G蛋白質共役型のレセプターの構造・性質の解明はこれらの系に作用するユニークな医薬品の開発につながる。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをより効率的に単離するための合成DNAプライマーを用いてウサギ胃幽門部平滑筋由来のcDNAをPCRにより増幅することに成功し、その解析を進めた。その結果、本発明者らは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするウサギ由来のcDNAを単離し、その部分的な構造を決定することに成功した。そして、このcDNAは、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とDNAおよびアミノ酸配列の部分的な相同性が認められたことから、ウサギの胃で発現機能している新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードしているDNAであることを見いだした。本発明者らは、これらの知見から、これらのDNAを用いれば、完全長の翻訳枠を持つcDNAを入手することができ、該レセプター蛋白質を製造することもできることを見いだした。さらに、本発明者らは、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを適当な手段で発現させた該レセプター蛋白質を用いれば、レセプター結合実験または細胞内セカンドメッセンジャーの測定等を指標に、生体内あるいは天然・非天然の化合物から該レセプター蛋白質に対するリガンドをスクリーニングすることができ、さらには、リガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを行なうこともできることを見いだした。

【0007】より具体的には、本発明者らは、[図1]に示すウサギ胃幽門部平滑筋由来の新規なcDNA断片をPCR法によって増幅し、プラスミドベクターにサブクローニングした(pMN7)。その部分配列の解析から、該cDNAが新規レセプター蛋白質をコードしていることを明らかになった。この配列をアミノ酸配列に翻訳したところ[図1]、第2、第3、第4、第5および第6膜貫通領域が疎水性プロット上で確認された[図2]。また、増幅されたcDNAのサイズも、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第2膜貫通領域と第6膜貫通領域の間の塩基数と比較して同程度の約0.8kbであった。G蛋白質共役型レセプター蛋白質はそのアミノ酸配列にある程度の共通性を示し、一つの蛋白質ファミリーを形成している。そこで、本件の新規レセプター蛋白質DNA(pMN7に含まれるcDNA)によってコードされるアミノ酸配列を用いてホモロジー検索を行なったところ、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるラットβ₃-アドレナリンレセプター蛋白質(A41679)、ラットセロトニン(5-HT₆)レセプター蛋白質(JN0591)、イヌヒスタミンH₂レセプター蛋白質(A39008)、ヒトソマトスタチンレセプター(タイプ4)蛋白質(JN0605)、ヒトドーパミンD₁レセプター蛋白質(S11377)、ラットニューロテンシンレセプター蛋白質(JH016

4)、ヒトコレシストキニンBレセプター蛋白質(JC1352)およびラットガストリンレセプター蛋白質(JQ1614)とアミノ酸でそれぞれ、27%、29%、27%、27%、24%、23%、31%および30%のホモロジーを有する全く新規なレセプター蛋白質であることが判明した。また本件の新規レセプター蛋白質DNAによってコードされるアミノ酸配列を用いて疎水性プロットを作成した結果、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に特徴的な疎水性ドメインの存在が明らかとなった。これらのことから、本発明の新規レセプター蛋白質がG蛋白質共役型レセプター蛋白質ファミリーに属するものであることがわかる。上記の()内の略語は、NBRF-PIRにデータとして登録される際の整理番号であり、通常Accession Numberと呼ばれるものである。

【0008】すなわち、本発明は、(1)配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、(2)第(1)項記載のいずれかのG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、(3)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(4)配列番号:2で表わされる塩基配列で表される塩基配列を有する第(3)項記載のDNA、(5)第(3)項記載のいずれかのDNAを含有することを特徴とするベクター、(6)第(5)項記載のベクターを保持する形質転換体、(7)第(6)項記載の形質転換体を培養し、形質転換体の細胞膜にG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造方法、(8)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする特徴とする第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

【0009】(9)(i)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と(ii)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと第(1)項記載のいずれかのG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする方法、(10)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、および(1

ド リレイテッド ペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine (IL-8, GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, MIP1 α , MIP-1 β , RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンである第(18)項または第(19)項記載のスクリーニング方法、(21)第(9)項、第(14)項~第(20)項記載のスクリーニング方法で得られる化合物またはその塩、(22)第(21)項記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬組成物、

【0014】(23)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする第(10)項記載のスクリーニング用キット、

(24)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする第(10)項記載のスクリーニング用キット、(25)第(10)項、第(23)項または第(24)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩、(26)第(25)項記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬組成物、および(27)第(11)項記載の抗体と、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩とを接触させることを特徴とする第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(2)項記載の部分ペプチドもしくはその塩の定量法を提供する。

【0015】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、温血動物(例えば、トリ、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル、ヒトなど)のあらゆる組織(例えば、胃、下垂体、膵臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など)または細胞などに由来するG蛋白質共役型レセプター蛋白質であって、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものであれば何なるものであってもよい。すなわち、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質などの他に、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と約90~99.9%の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが挙げられる。実質的に同質の活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナ

ル情報伝達などが挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、レセプター蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

【0016】より具体的には、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有するウサギ胃幽門部平滑筋由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質などが挙げられる。また、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども挙げられる。さらに、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質には、N末端のMetが保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁- α アシル基など)で保護されているもの、GluのN端側が生体内で切断され、該Gluがピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁- α アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

【0017】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩は、温血動物の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。具体的には、[図2]で示される本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロット解析において細胞外領域(親水性(Hydrophilic)部位)であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性(Hydrophobic)部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドで

ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどがそれぞれ利用できる。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクター α ・シグナル配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。

【0023】宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌、バチルス属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)]などが用いられる。バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) M1114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)]などが用いられる。

【0024】酵母としては、たとえばサッカロマイセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁺, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら, ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。動物細胞としては、たとえばサル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (dhfr⁻ CHO細胞), マウスL細胞, マウスミエローマ細胞, ヒトFL細胞な

どが用いられる。エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なわれる。酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。

【0025】昆虫細胞を形質転換するには、たとえばバイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0026】エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質

役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドを探索または決定するための試薬として有用である。すなわち、本発明は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP（バソアクティブインテスティナル アンド リレイテッド ペプチド）、ソマトスタチン、ドーバミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine（IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなど）の他に、例えば温血動物（例えば、トリ、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒトなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

【0032】具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。本発明のリガンド決定方法においては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質または該部分ペ

チドに対する試験化合物の結合量、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

【0033】より具体的には、本発明は、

①標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定しすることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

【0034】④試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

【0035】本発明のリガンド決定方法の具体的な説明を以下にする。まず、リガンド決定方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明のG蛋白質共役型

社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量(5000cpm~500000cpm)の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^1\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が0cpmを越える試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドとして選択することができる。

【0040】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の④~⑤の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0041】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンド決定用キットは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋

白質を含有する細胞の膜画分を含有するものである。本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution(ギブコ社製)に、0.05%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂ 95%airで2日間培養したもの。

【0042】③標識試験化合物

市販の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^1\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100~1000倍濃い濃度に調製する。

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定する。

【0043】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合することができるリガンドとしては、例えば脳、下垂体、膵臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的にはアンギオテンシン、モンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP(バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αお

その塩と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

【0048】(4) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(いわゆる、本発明のG蛋白質共役型レセプターアゴニスト)と該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、本発明のG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト)などが含まれる。

【0049】すなわち、本発明は、(i) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドを接触させた場合と

(ii) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法においては、(i) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドに、リガンドを接触させた場合と(ii) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドに、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

【0050】より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0051】③標識したリガンドを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

④本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物(例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドなど)を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のG蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方

0000rpm)で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^5 \sim 10^6$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0056】リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識したリガンドが必要である。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば、 $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識されたリガンドなどを利用することができる。具体的には、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4～10(望ましくはpH6～8)のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドXとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM(花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。

【0057】さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～1.0mlの該レセプター溶液に、一定量(5000cpm～500000cpm)の標識したリガンドを添加し、同時に $10^{-4}M \sim 10^{-10}M$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγカウン

ターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B_0)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント($B_0 - NSB$)を100%とした時、特異的結合量($B - NSB$)が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0058】リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物スクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞としては、天然型の本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を有する細胞株(例えば、マウス脾臓β細胞株MIN6など)、前述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質発現細胞株などが望ましい。試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0059】リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有するものである。本発明のスクリ

ート80 (TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形で通常成人(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0066】(5)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体または抗血清の製造

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体(例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体)または抗血清は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。例えば、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a)モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩(以下、G蛋白質共役型レセプターと略称する場合がある)は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常

2~6週毎に1回ずつ、計2~10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

【0067】モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2~5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化G蛋白質共役型レセプターと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としては例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG(好ましくはPEG1000~PEG6000)が10~80%程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0068】抗G蛋白質共役型レセプター抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、G蛋白質共役型レセプター抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相(例、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したG蛋白質共役型レセプターを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培

標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0073】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてG蛋白共役型レセプターの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる(例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照)。以上のように、本発明のG蛋白共役型レセプター抗体を用いることによって、G蛋白共役型レセプターを感度良く定量することができる。

【0074】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があ

り得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA : デオキシリボ核酸
cDNA : 相補的デオキシリボ核酸
A : アデニン
T : チミン
G : グアニン
C : シトシン
RNA : リボ核酸
mRNA : メッセンジャーリボ核酸
dATP : デオキシアデノシン三リン酸
dTTP : デオキシチミジン三リン酸
dGTP : デオキシグアノシン三リン酸
dCTP : デオキシシチジン三リン酸
ATP : アデノシン三リン酸

【0075】

EDTA : エチレンジアミン四酢酸
SDS : ドデシル硫酸ナトリウム
EIA : エンザイムイムノアッセイ
Gly : グリシン
Ala : アラニン
Val : バリン
Leu : ロイシン
Ile : イソロイシン
Ser : セリン
Thr : スレオニン
Cys : システイン
Met : メチオニン
Glu : グルタミン酸
Asp : アスパラギン酸

【0076】

Lys : リジン
Arg : アルギニン
His : ヒスチジン
Phe : フェニルアラニン
Tyr : チロシン
Trp : トリプトファン
Pro : プロリン
Asn : アスパラギン
Gln : グルタミン
pGlu : ピログルタミン酸
Me : メチル基
Et : エチル基
Bu : ブチル基
Ph : フェニル基
TC : チアゾリジン-4(R)-カルボキ
サミド基

【0077】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

【配列番号: 1】 pMN7に含まれるウサギ胃幽門部平

NA画分の調製およびcDNAの合成

ウサギ胃幽門部平滑筋よりグアニジンイソチオシアネート法により Total RNAを調製後 (Kaplan B.B. et al., Biochem. J. 183, 181-184 (1979)), mRNA精製キット (ファルマシア社) を用いて, poly(A)⁺RNA画分を調製した。次に, poly(A)⁺RNA画分 5 μ g にプライマーとしてランダムDNAヘキサマー (BRL社) を加え, モロニマウス白血病ウイルスの逆転写酵素 (BRL社) により, 添付バッファーを用いて相補DNAを合成した。反応後の産物はフェノール:クロロホルム (1:1) で抽出し, エタノール沈殿を行なった後, 30 μ l のTEに溶解した。

【0083】

【実施例2】ウサギ胃幽門部平滑筋由来cDNAを用いたPCR法による受容体cDNAの増幅と塩基配列の決定

実施例1でウサギ胃幽門部平滑筋より調製したcDNA 1 μ l を鋳型として使用し, 参考例1で合成したDNAプライマーを用いてPCRによる増幅を行なった。反応液の組成は, 合成DNAプライマー (配列: 5' プライマー配列および3' プライマー配列) 各100 pM, 0.25 mM dNTPs, Taq DNA polymerase 1 μ l および酵素に付属のバッファー10 μ l で, 総反応溶液量は100 μ l とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー社) を用い, 96℃・30秒, 45℃・1分, 60℃・3分のサイクルを25回繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行なった。

【0084】

【実施例3】PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解読による新規レセプター候補クローンの選択

実施例2で行なったPCR後の反応産物は1.4%のアガロースゲルを用いて分離し, バンドの部分のカミソリで切り出した後, エレクトロエリユージョン, フェノール抽出, エタノール沈殿を行ってDNAを回収した。TAクローニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い, 回収したDNAをプラスミドベクターpCR^{II}へサブクローニングした。これを大腸菌JM109 competent cell (宝酒造株式会社) に導入して形質転換したのち, cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン, IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地中で選択し, 白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離し, 形質転換体を100クローン得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晩培養し, 自動プラスミド抽出装置PI-100 (クラボウ) を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い, 挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNA

の一部をさらにRNase処理, フェノール・クロロホルム抽出し, エタノール沈殿によって濃縮した。

【0085】塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社) を用いて行い, 蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた塩基配列を基に, DNASIS (日立システムエンジニアリング社) を用いてホモロジー検索を行なった結果, 形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) JM109/pMN7の保有するプラスミドに挿入されたcDNA断片が新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすることが分かった。該cDNA断片の塩基配列を〔図1〕に示した。さらに確認するために, DNASIS (日立システムエンジニアリング社) を用い, 塩基配列をアミノ酸配列に変換した後〔図1〕, 疎水性プロット〔図2〕を行なった結果, G蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを示す疎水性ドメインが存在することが確認された。また, アミノ酸配列に基づくホモロジー検索を行なった結果, 例えば, ラット由来 β -アドレナリンレセプター蛋白質 (A41679) と27%, ラット由来セロトニン (5-HT₆) レセプター蛋白質 (JN0591) と29%, イヌ由来ヒスタミンH₂レセプター蛋白質 (A39008) と27%, ヒト由来ソマトスタチンレセプター (タイプ4) 蛋白質 (JN0605) と27%, ヒト由来ドーパミンD₁レセプター蛋白質 (S11377) と24%, ラット由来ニューロテンシンレセプター蛋白質 (JH0164) と23%, ヒト由来コレシストキニンBレセプター蛋白質 (JC1352) と31%, ラット由来ガストリンレセプター蛋白質 (JQ1614) と30%のホモロジーを有する新規なレセプター蛋白質であることが判明した。上記の()内の略語は, NBRF-PIRにデータとして登録される際の整理番号であり, 通常 Accession Number と呼ばれるものである。

【0086】

【発明の効果】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質および該蛋白質をコードするDNAは, ①リガンドの決定, ②抗体および抗血清の入手, ③組み替え型レセプター蛋白質の発現系の構築, ④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング, ⑤構造的に類似したりガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施, ⑥遺伝子診断におけるプローブ, PCRプライマーの作成, ⑦遺伝子治療等に用いることができる。特に, G蛋白質共役型のレセプターの構造・性質の解明はこれらの系に作用するユニークな医薬品の開発につながる。

【0087】

【配列表】

【配列番号: 1】

配列の長さ: 252

配列の型: アミノ酸

43

44

TCCTTCCACC TCTATGTGGC CCTGAGCGCT CAGCCCATG CAGCGGGGCA GGTGGAGAAC 720
GTGGTGACCT GGATTGGCTA CTCTGCTTC ACCTCC 756

【0089】

【配列番号：3】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：NはIを示す。

配列

GYCACCAACN WSTTCATCCT SWNHCTG 27

【0090】

【配列番号：4】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：NはIを示す。

配列

ASNSANRAAG SARTAGANGA NRGGRIT 27

【0091】

【図面の簡単な説明】

【図1】ウサギ胃幽門部平滑筋よりPCR増幅によって得た新規レセプター蛋白質cDNAクローンpMN7に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列（第1番目～第540番目）およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。塩基配列の5'端に示した下線部分は、PCR増幅に用いた合成プライマーに相当する。

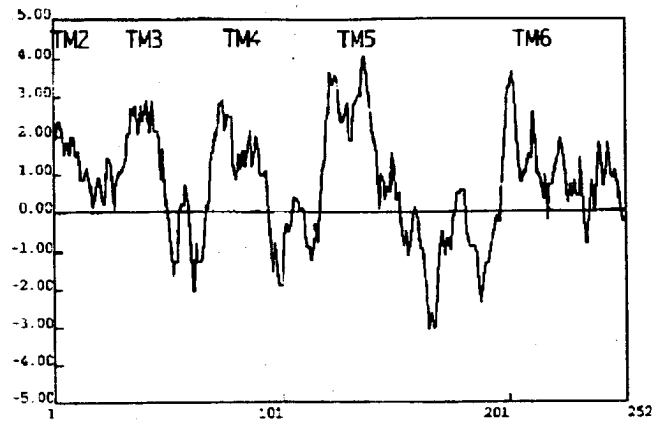
【図2】ウサギ胃幽門部平滑筋よりPCR増幅によって得た新規レセプター蛋白質cDNAクローンpMN7に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列（第541番目～第810番目）およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。塩基配列の3'端に示した下線部分は、PCR増幅に用いた合成プライマーに相当する。

【図3】図1および図2に示したアミノ酸配列をもとに作成した、pMN7に含まれるウサギ胃幽門部平滑筋由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされる蛋白質の疎水性プロットを示す。この図からT M 2～T M 6で示す疎水性ドメインの存在が示唆される。

【図2】

549	558	567	576	585	594
TCC GAG TCT CTC AGC AGC CGC TCC ACT ATG GTC ACC AGC TCG GGG GCC CCG CAG					
Ser Glu Ser Leu Ser Ser Arg Ser Thr Met Val Thr Ser Ser Gly Ala Pro Gln					
603	612	621	630	639	648
ACC ACC CCT CAC CGG ACG TTT GGC GGA GGG AAG GCA GCA GTG GTC CTC CTG GCT					
Thr Thr Pro His Arg Thr Phe Gly Gly Gly Lys Ala Ala Val Val Leu Leu Ala					
657	666	675	684	693	702
GTG GGA GGA CAG TTC CTG CTC TGT TGG TTG CCC TAC TTC TCC TTC CAC CTC TAT					
Val Gly Gly Gln Phe Leu Leu Cys Trp Leu Pro Tyr Phe Ser Phe His Leu Tyr					
711	720	729	738	747	756
GTG GCC CTG AGC GCT CAG CCC ATT GCA GCG GGG CAG GTG GAG AAC GTG GTG ACC					
Val Ala Leu Ser Ala Gln Pro Ile Ala Ala Gly Gln Val Glu Asn Val Val Thr					
765	774	783	792	801	810
TGG ATT GCC TAC TTC TGC TTC ACC TCC <u>AAC CCT CTC CTC TAT TCC TTC CTC CCT 3'</u>					
Trp Ile Gly Tyr Phe Cys Phe Thr Ser					

【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/566			A 6 1 K 39/395	N
// A 6 1 K 39/395			48/00	
48/00		9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A